Feel so Bio 19キットシリーズ

#005　DNA結合 キット

取扱説明書

ver.1.4

目次

本キットの特徴

本キットは、遺伝子工学において最も重要な働きを持つ酵素の一つ、「DNA結合酵素」について学ぶキットです。

DNA結合酵素（DNAライゲース）は、DNA断片同士を結合させる働きを持つ酵素です。本キットでは、このDNA結合酵素を用い、制限酵素で処理されたラムダファージのDNA断片を結合する実験を行います。DNA結合酵素は、現在の遺伝子工学において非常に重要な役割を果たしています。

本キットは、Feel so Bio 19キットシリーズ＃004「制限酵素キット」とセットで実験を行うことにより、現在の遺伝子工学で中心的な技術となっている遺伝子のクローニング技術について学習することが可能です。

キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧

キット内容 【生徒20名（2人一組）分】

・DNA断片溶液	(70μL)	1本
・ライゲース	(20μL)	1本
・10xライゲースバッファー	(20μL)	1本
・精製水	(20μL）	1本
・ローディングバッファー	(70μL)	1本
・DNAマーカー	(60μL)	1本
・40倍濃縮電気泳動バッファー	(25mL）	1本
・アガロース	(2g)	1袋
・マイクロチューブ	(20本)	1袋
・取扱説明書 (本書)		1冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・マイクロピペット	20μL用	5本（各班1本）
	200μL用	1本（分注用）
・マイクロピペット用チップ		6箱（各班1個及び予備）
・37℃恒温槽		1個
・電気泳動槽		1～2個

ミニゲルを2個泳動できる個数をご用意下さい。

・DNA染色液	適量

株式会社アドバンス社のMupid Blueを推奨しています。
（Mupid Blueを用いた染色法はp13に記載しました。）

・染色用タッパー	5個（各班1個）
・脱色用タッパー	5個（各班1個）

※キットに含まれる電気泳動関係の試薬の量は、株式会社アドバンス社の　電気泳動槽、Mupid Sの使用を想定しております。

※機材につきましては弊社で取り扱っております。ご入用の際にはお問合せ下さい。

内容物について

DNA断片溶液

ラムダ・ファージ由来のDNAを*Haemophilus influenzae* Rd.由来の制限酵素*Hind* IIIで切断したDNA溶液です。DNAの分解を防ぐ目的でTEバッファーに溶解してあります。必ず氷上で融解し、使用時も氷上に静置してマイクロチューブを温めないようご注意ください。また、使用後は速やかに-20℃に戻し、保存してください。

ライゲース

T4ファージ由来の、DNA断片を連結する活性を持つ酵素です。酵素は常温では短時間で失活しますので、**必ず-20℃にて保存してください**。T4 DNA ligaseは使用時には必ず氷上に置き、チューブを温めないようにご注意ください。使用後は速やかに-20℃に戻し、保存してください。本酵素は、室温（16～26℃）で高い活性を示します。

10xライゲースバッファー

T4 DNA ligaseが最も高いDNA連結活性を発揮するように調製されたバッファーです。本バッファーはT4 DNA ligaseが働くために必要なATPを含んでいます。-20℃にて保存してください。10倍に濃縮されておりますので、反応溶液の半量を使用ください。

精製水

DNA分解酵素、RNA分解酵素が含まれていないことを確認した精製水です。-20℃にて保存してください。

アガロース

核酸、タンパク質などの生体高分子を完全に除去した精製アガロースです。高温多湿をさけ、常温にて保存してください。

ローディングバッファー

DNAサンプルをアガロースゲルにアプライする際に使用します。常温にて保存してください。色素を含むため、手や衣服につくと落ちにくいので、取り扱いには十分にご注意ください。

40倍濃縮電気泳動バッファー

40倍の濃度に濃縮したTAE(トリス-酢酸-EDTA)バッファーです。アガロースゲルの作成および、DNAサンプルをアガロースゲル電気泳動法により分離する際の泳動バッファーとして使用します。4℃にて保管してください。電気泳動用バッファーとして使用の際は、精製水で40倍に希釈してご使用ください。

※内容物が微量なため、マイクロチューブの蓋についていることがございます。その際には、手で振ってマイクロチューブの底に溶液を集めてからご使用ください。

分注について

班構成

本実験キットでは4人1班(実験は2人一組)を推奨しています。

機材一班分

DNA断片溶液	・・・20μL
ライゲース	・・・3μL
10×ライゲースバッファー	・・・3μL
精製水	・・・3μL
ローディングバッファー	・・・12μL
DNAマーカー	・・・10μL
40倍濃縮電気泳動バッファー	・・・100mL (40倍希釈後)
アガロースゲル	・・・1個

※使用する電気泳動層により必要量が変わります。本実験では、株式会社アドバンスの電気泳動層、Mupid Sの使用を想定しております。

※内容物についての項、及び実験手順の項に従って試薬を溶解してください。

DNAライゲースについて

DNAのハサミとノリ

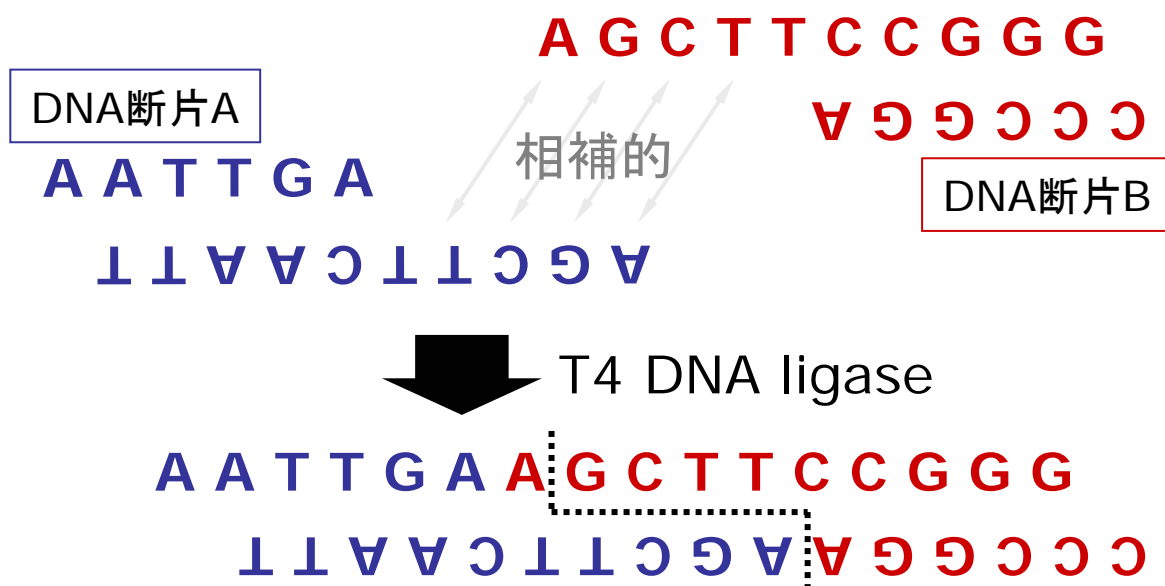
DNA配列を自らの考えたとおりにデザインする技術は、現在のバイオテクノロジーにとって不可欠な技術となっています。この技術の根幹を支えている反応は、DNAを切断する酵素、およびDNAを連結する酵素です。これらの反応は、遺伝子のクローニング技術の中で最も基礎的な重要な反応であり、この反応を利用することにバイオテクノロジーは急速な発展を遂げました。

このうちDNAを切断する「ハサミ」として働く酵素は制限酵素であり（→＃004 DNA切断キット）、DNAを連結する「ノリ」として働く酵素がDNAライゲース（ligase）です。本キットでは、DNAライゲースの働きについて学習することが可能です。

DNAライゲース （DNA ligase）

本キットで使用するDNA ligaseは、組換え大腸菌株由来のT4 DNA ligaseです。T4 DNA ligaseは、1本鎖DNAとして突出した末端配列が相補的（A-T, G-Cの組み合わせ）なDNA断片同士を連結する活性を持っています。下図は、制限酵素*Hind* IIIによって切断されたDNA断片がT4 DNA ligaseによって連結する模式図を示しています。DNA断片A（青字）およびDNA断片B（赤字）の突出末端部位は、互いに相補的な配列になっています。これらの断片が、T4 DNA ligaseの働きにより1本のDNA断片に連結されます。

A G C T T C C G G G
A G G C C C
DNA断片A
相補的
A A T T G A
DNA断片B
T T A A C T T C G A

A A T T G A A G C T T C C G G G
T T A A C T T C G A A G G C C C

アガロースゲル電気泳動の原理

アガロース電気泳動法とは

　アガロース電気泳動法は、DNAやRNAなどの核酸をそれらの電気的な性質を利用して分離する方法です。核酸は「－」の電荷を帯びているため、電場に置かれると、アガロース（※）のゲルの網目構造内を＋極側に移動します。長いDNA断片は網目構造内をゆっくりと（引っかかりながら）動くのに対して、短いDNA断片はより速く（あまり引っかからずに）動くことから、アガロースゲル電気泳動法では、DNA断片を長さによって分離することが可能です。この方法はバイオテクノロジーの研究においてDNA断片の際に用いられる最もポピュラーな方法であり、現在のバイオテクノロジーを支える最も基本的な技術です。

※アガロースとは？
　アガロースとは、「寒天」の主要な成分のことです。二種類の糖が結合しあって網目状の構造をとることから、生体高分子、特にDNAの分子量を分析する際によく利用されます。

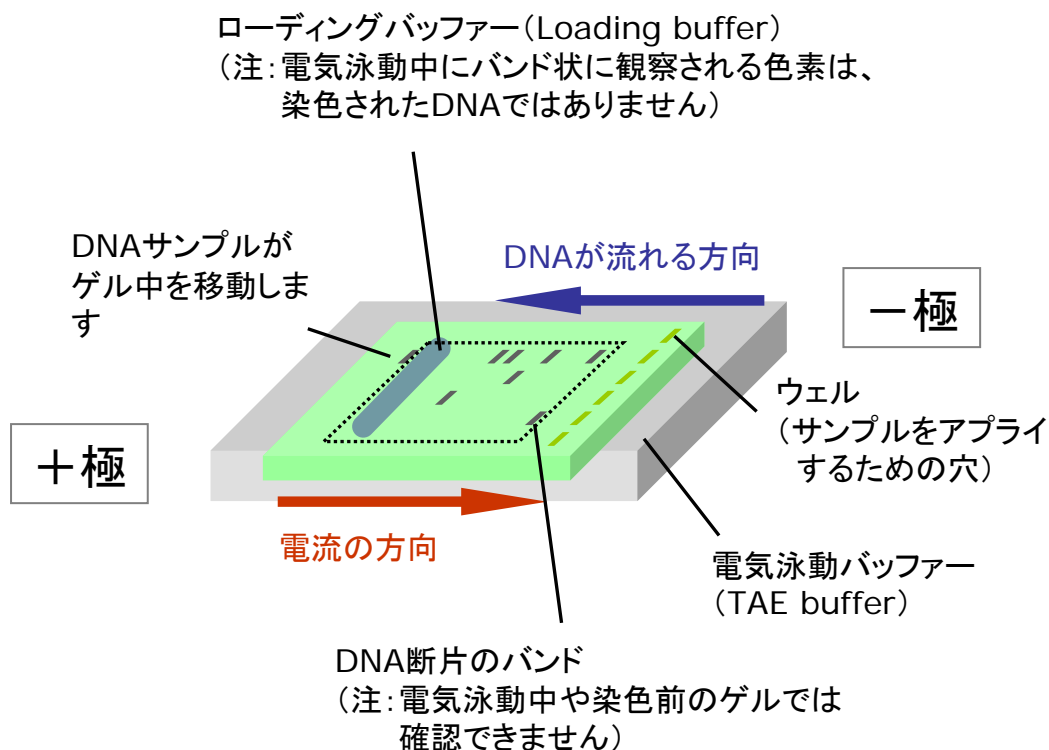
DNAの電気的性質

DNAは、リン酸基・塩基・デオキシリボース(糖の一種)によってできる「ヌクレオチド」とよばれる分子が直鎖状につながった構造をとっています。このうちリン酸基と塩基が荷電しています。

DNAの場合、塩基の荷電は二重鎖構造をとるために打ち消されているので、水溶液中ではリン酸基のみが荷電しており、したがってDNAはヌクレオチド数、すなわち分子量(※)に比例した電荷を持っていることになります。これはDNAの電気的な性質で最も重要な点です。

※DNAはヌクレオチドが直鎖状につながった構造をとるため、分子量はそのヌクレオチド数に比例します(塩基の種類によって多少の誤差が生じます)。一般的にDNAの大きさは分子量で表わさずヌクレオチドの長さ(塩基対数、base pair:bp)で表わします。

アガロースゲル電気泳動法では、このようなDNAの電気的な性質を利用します。アガロースによるゲルマトリックス(アガロースゲル)内に電圧をかけることで電場を生じさせ、DNA断片を長さ(単位は塩基対を意味するbp:base pair)によって分離します。DNAは二重らせんとよばれる単一な構造をとっているため、DNAは分子量による移動度の差によって分離することができます。

下の図は、アガロースゲル電気泳動の模式図を示しています。アガロースゲル電気泳動を行う際には、サブマリン電気泳動槽とよばれる機器を使用します。まず電気泳動槽を、導電性でかつDNAの分解が起こりにくいTAEバッファーで満たし、TAEバッファー中にアガロースゲルを静置します。アガロースゲルには、ウェルとよばれるサンプルを注入(アプライ)するための穴があり、ここにDNAサンプルをマイクロピペットを用いてアプライします。DNAサンプルのアプライ後のゲルに電圧をかけ電流を流すことでDNA断片をサイズによって分離することができます。

DNAサンプルを電気泳動する際には、あらかじめDNAサンプルをローディングバッファーと混和します。これによりDNAサンプルは、泳動バッファー中に拡散することなく、ウェル内にアプライすることが可能となります。ローディングバッファーには、電気泳動中にサンプルの移動度の目安となる色素や、ウェルにDNAサンプルを沈ませるためのグリセロールなどが含まれています。

あらかじめDNA断片のサイズの分かっているDNAサンプルを「DNAのモノサシ」として隣のレーンに電気泳動することで、未知のサンプルの分子量を検討することも可能です。

電気泳動の終了後は、DNA断片を可視化するために染色します。DNA染色に用いられる試薬としては、エチジウムブロマイド（EtBr）、Mupid Blueなどが挙げられます。EtBrは検出感度に優れていますが、DNAの二重鎖の間に入り込む（インターカレーションする）物質であり、発がん性が認められます。また、DNA断片のバンドの観察の際に紫外線ランプが必要となるため、ビニール手袋を必ず着用し、防護メガネを使用するなど、取扱いには十分な注意が必要です。本キットでは、安全なMupid Blueを使用の使用を推奨します。

電気泳動の準備と手順

実験の手順（実験前に準備していただくこと）

①　電気泳動バッファーの作成

40倍濃縮泳動バッファーを975mLの精製水で40倍に希釈します。
キットで使用を推奨している電気泳動層、Mupid-Sでは電気泳動バッファーを約100mL/台　使用します。

②　アガロースゲルの作成

１）300mLの三角フラスコに1.4gのアガロースを入れ ①で作成した1xTAEバッファー200mLを加えよく混ぜます。三角フラスコの口をラップで軽く閉じ電子レンジで加熱してアガロースを完全に融解させます。この作業はアガロースの粒子が見えなくなるまで行ってください。加熱の際は、沸騰による噴出に注意してください。なお、この作業は突沸した水蒸気が手にかかるなどやけどの危険性がありますので、必ず軍手の上にビニール手袋をして作業を行ってください（**この作業はやけどの危険があります。必ず指導者が行うようにしてください**）。

２）溶解させたアガロースは、電気泳動槽付属のゲルメーカーを用いて成型します。②で融解したアガロースを、ある程度（50℃程度）まで冷ました後、ゲルメーカーに流し込み、上からウェルを作成するためのコームを差し込みます。アガロースが固まるまで上からアルミホイルで覆い、静置してください。
※200mLのアガロース溶液で、小さいゲルが約8枚、大きなゲルでは4枚作成できます。ゲルメーカーが一個しかない場合で、小さいゲルを4枚以上作成したいときには、１）のステップで、0.7gのアガロースを100mlの泳動バッファーに溶かすなどして、小分けにゲル作成を行なってください。また、一度固まってしまったゲルでも、再度レンジで温めることで溶解し、ゲルを作成することが可能です。

作成したアガロースゲルは、希釈後の泳動バッファーに浸した状態で一ヶ月程度常温保存が可能です。また、使用前にはウェルの底に穴が開いていないことを目視で確認してください。

実験手順

1）氷上でDNA断片溶液、10xライゲースバッファー、精製水を融解させます。

2）マイクロチューブに、10xライゲースバッファー 1μL、DNA断片溶液 8μLを入れ、マイクロピペットで均一に混ぜあわせます。この混合溶液を各班につき、2本ずつ作成し、マイクロチューブの蓋に一方は「①」他方には「②」と油性ペンで記入します。

3）2）で作成した混合溶液を氷上で5分間、静置してください。

4）各班2本のマイクロチューブ「①」にはライゲースを1μL加え、「②」には精製水 1μL加えてください（※）。それぞれの混合溶液はマイクロピペットで均一になるよう混ぜあわせてください（注：**ライゲースのマイクロチューブは必ず氷上に置いて作業してください。使用後は速やかに-20℃へ移動してください**）。

5）氷上から室温にマイクロチューブを移し、室温で30分間静置してください（注：室温でも酵素反応は可能ですが、酵素の活性が弱くなり、結合が不完全になる可能性がありますのでご了承ください）。

※　②のように、ライゲースを加えないサンプルを調整することで、ライゲースによる作用を確かめることができます。ライゲースは10反応分用意してありますので、両方のチューブにライゲースを加えることも可能です。

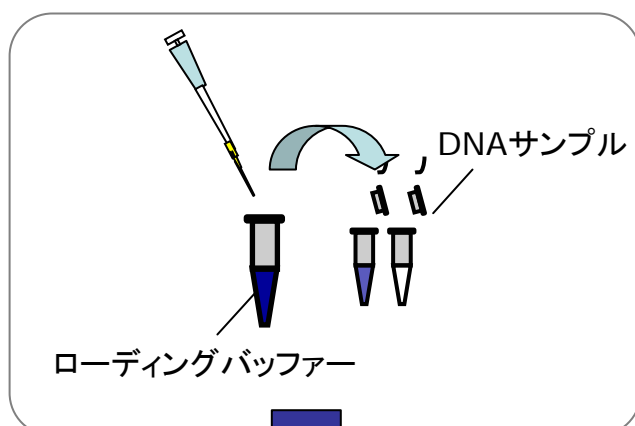
※　内容物が微量なため、マイクロチューブの蓋についていることがございます。その際には、手で振ってマイクロチューブの底に溶液を集めてからご使用ください。

実験の手順

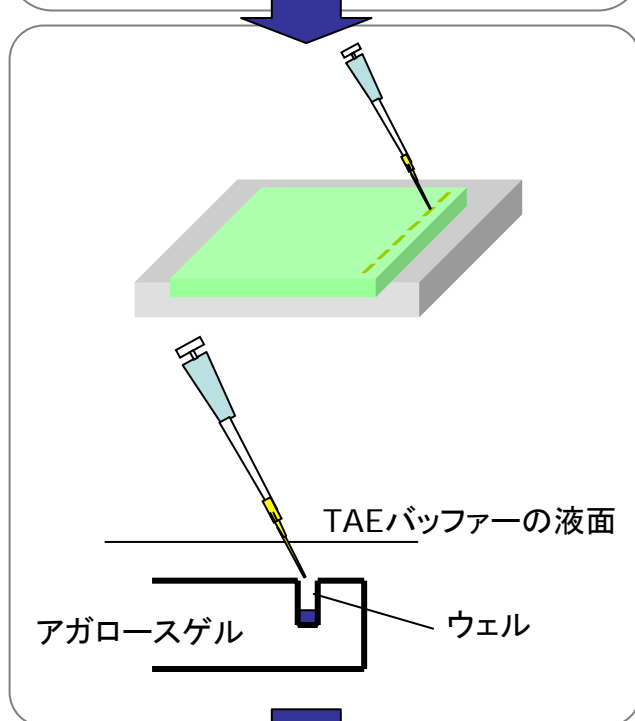
① 電気泳動槽の準備

電気泳動槽に電気泳動バッファーを加え、電気泳動槽内のマイナス極側にウェルが来るようにアガロースゲルをセットします。アガロースゲルのウェルが必ず電極と平行になるようにセットしてください。使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください（参考：Mupid-Sでは約100mL程度）。

② DNAサンプルの調整

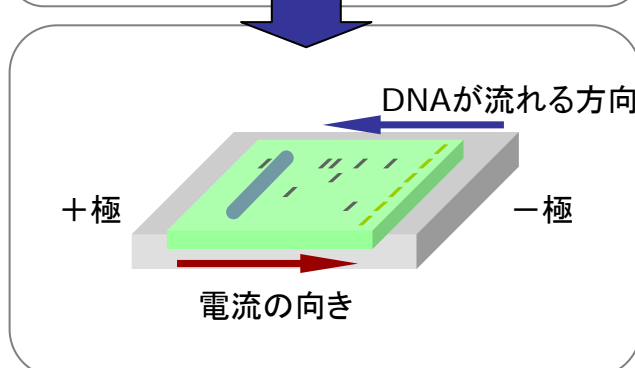
本キット添付のローディングバッファーを2μLずつライゲース処理の終了したDNAサンプルに加えよく混ぜます（合計12μL）。DNAマーカーにも2μLのローディングバッファーを加えてよく混ぜてください。

③ DNAサンプルのアプライ

DNAサンプルを別々のウェルにアプライします。

アプライは、右図のようにチップの先をウェル内まで入れないようにします。チップの先端でウェルを破壊しないよう、細心の注意を払ってください。

④ アガロース電気泳動

電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。DNAはマイナスの荷電を持っていますので、プラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください（参考：Mupid-Sでの電気泳動条件は100ボルトで20分程度となります）

⑤ アガロースゲルの染色

次ページ「DNA染色の方法」をご覧ください。

DNA染色の推奨方法

＜Mupid Blueを使用したDNA染色法＞

Mupid Blue

　50倍に濃縮されたDNAの染色液です。電気的性質によってDNAと結合することで青色を呈するため、電気泳動の結果を確認することが可能です。インターカレーション型と呼ばれる染色液と異なり、発がん性がなく安全な試薬です。常温にて保存し、使用の際は精製水にて50倍に希釈してご使用ください。

DNA染色液による染色では脱色の操作が必要となります。脱色の操作では精製水を用います。
※ DNA染色液は無害ですが色素を含んでおり、衣服・皮膚などに付くと汚れますので取扱いの際にはビニール手袋・白衣等を着用することをお勧めします。

① DNA染色液を精製水で50倍希釈し、タッパーに入れる。脱色用の水をタッパーに用意しておく。
② 電気泳動の終わったアガロースゲルをDNA染色液のタッパーに入れ、2分間ゆっくりと手で振盪する（2分以上染色を続けると脱色がきれいにできなくなりますので、時間を厳守してください）。
⑤ 精製水にアガロースゲルを移し、DNA断片のバンドが確認できるまで精製水を交換しながらゆっくりと手で振盪する。
⑥ 観察（デジタルカメラ等でアガロースゲルを撮影することが可能です。

付録1　電気泳動法

泳動バッファー

　DNAの電気泳動では、一般にTAE bufferやTBE bufferが用いられます。TAE bufferは数kb以上の比較的長いDNA断片の分離に適しているのに対して、TBE bufferはそれよりも短いDNAの分離に適しています。

アガロースゲルの濃度

　電気泳動法によるDNAの分離実験では、ゲルの作成の際のアガロースの濃度が非常に重要となります。アガロースの濃度が上がれば上がるほどゲルマトリックス分子とDNA断片の相互作用は強くなりDNA断片の移動度が小さくなるため、より細かいDNA断片の分離が可能となります。分離したいDNA断片の長さによって適当なアガロース濃度を選択することが大切です。本キットでは、0.7%のアガロースゲルを使用することを推奨しています。

アガロース濃度 (%)	分離できるDNA断片の長さ (bp)
0.6	1,000～20,000
0.7	800～10,000
1	500～7,000
1.2	400～6,000
1.5	200～3,000
2	100～2,000

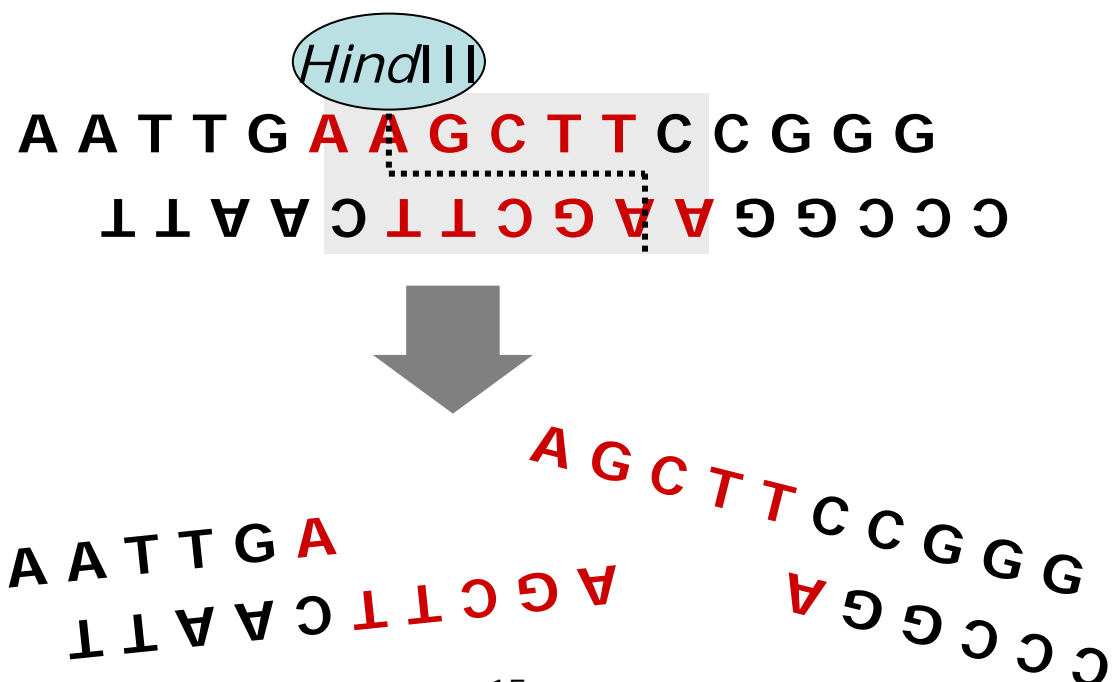
付録2　制限酵素

制限と制限酵素

細菌は自分以外のDNAを切断・分解することで、ウイルスやファージなどの外から侵入してくるDNAを排除しています。この外来DNAの排除メカニズムは「制限」と呼ばれています。制限で中心的な役割をする酵素が「制限酵素」です。制限酵素は特定のDNAの配列を認識して切断することが知られています。

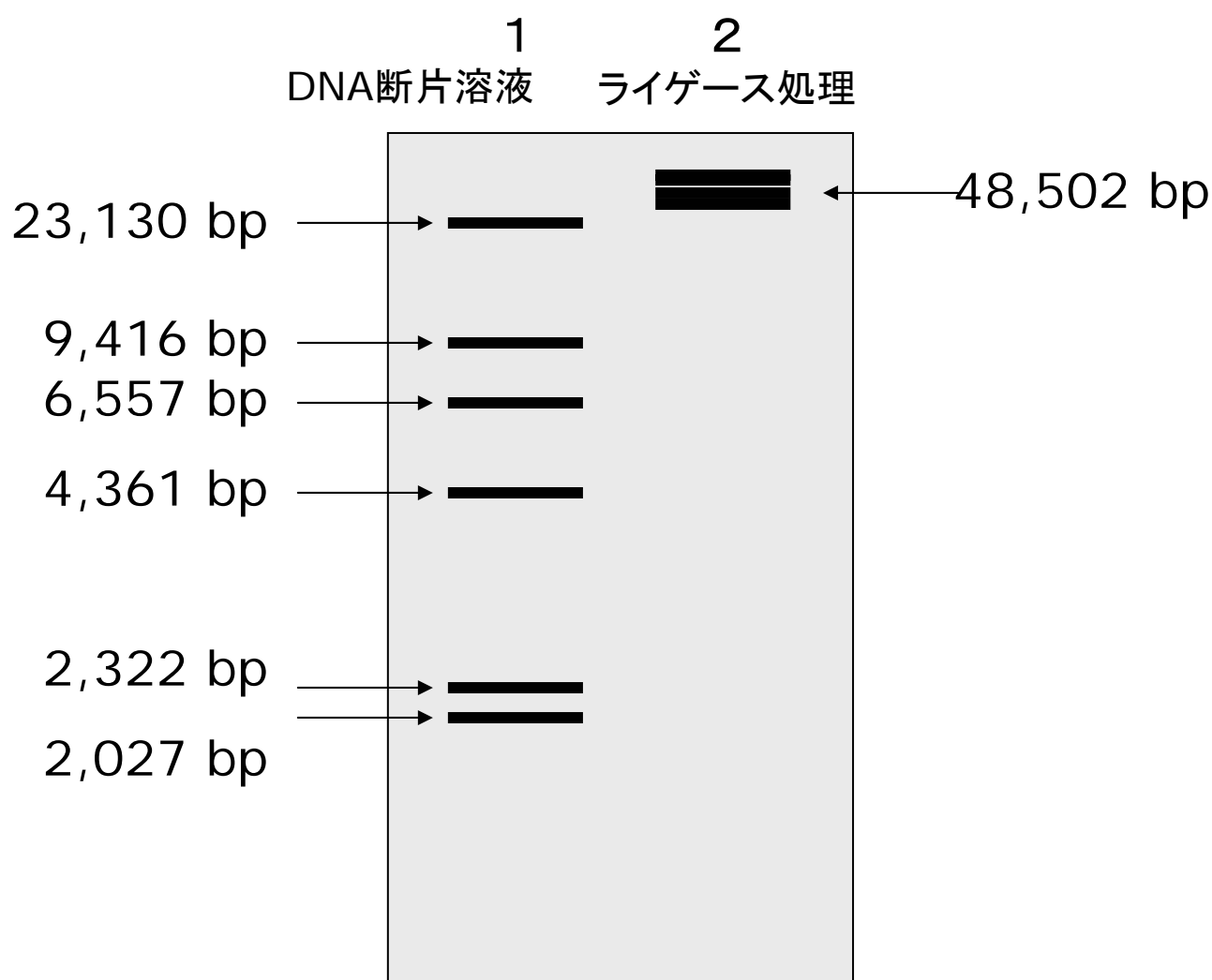
制限酵素の性質

制限酵素は、特定のDNAの配列を認識し切断する酵素です。大部分の制限酵素は4塩基、6塩基または8塩基のあるDNAの配列を認識し、切断します。

制限酵素の大きな特徴は、その認識するDNAの配列がパリンドローム（回文）構造をとっていることです。パリンドローム構造とは、「シンブンシ（新聞紙）」のように前から読んでも後ろから読んでも同じことを指しますが、2本鎖のDNAにおけるパリンドローム構造とは下図のような配列（灰色四角）を指します。例えば、制限酵素*Hind* IIIはこのパリンドローム配列（赤字）を認識して特定の箇所（点線の部分）で切断します。

付録3　予想されるバンド像

***Hind*Ⅲはラムダ DNAを7箇所で切断する**

*Hind*Ⅲはラムダ DNAの中にあるAAGCTTという配列を認識し切断します。このようなDNA配列はラムダDNAの中に7箇所存在しています。つまり*Hind*Ⅲによる切断後には8本のDNA断片が存在することになりますが、アガロースゲル電気泳動法では、これらのうち6本のバンドについて目で確認することができます（2本についてはDNA断片が短いため、0.7％アガロースゲルを用いた電気泳動での確認は難しくなっています）。

ライゲースはこの7つの断片をくっつける働きがあります。結合する順番までは指定できないため、様々な長さのDNA断片が現れるはずです。その中で、ある程度濃度が高いものが、染色後に観察できます。

ご使用上の注意

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載されたプロトコル以外での使用につきましては、保証の限りではございません。

商品のご返品について

　商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

カスタマーサポート

　Feel so Bioシリーズ　カスタマーサポート係
　　TEL：03-6277-8041
　　FAX：03-6277-8042
　　Mail：info@feelsobio.net

※FAXをご利用の場合は、同封のFAX用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

株式会社リバネス　http://www.leaveanest.com

〒160-0004
東京都新宿区四谷2-8 藤井ビル5F
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042

販売

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
TEL：（03）5632-9610　FAX：（03）5632-9619
e-mail：mail@cosmobio.co.jp
URL：http://www.cosmobio.co.jp/